巨蝮蛇（*Lachesis muta*）毒出血毒素的纯化和性质研究

冉永禄
（中国科学院昆明动物研究所）

Anthony T. Tu
(*Department of Biochemistry, Colorado State University, Fort Collins, Colorado* 80523)

关键词 巨蝮蛇 出血毒素 凝胶过滤 层析 直线梯度 纤维蛋白原

摘 要

应用 Sephadex G—75 凝胶过滤、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析和 DEAE-3 SW Spherogel 高压液相层析三步分离纯化程序，从巴西巨蝮蛇毒中获得二个具有蛋白水解酶活力的出血毒素Ⅳ—Ⅰ和Ⅳ—Ⅱ。它们在SDS凝胶电泳鉴定时显示出单一的蛋白带。Ⅳ—Ⅰ和Ⅳ—Ⅱ的分子量用SDS凝胶电泳测定分别为22,000和23,000，而等电点分别为6.50和6.12。Ⅳ—Ⅰ的最小出血剂量是25微克，Ⅳ—Ⅱ是0.5微克。当这两个出血毒素分别与纤维蛋白原保温时，都具有像胞浆素水解纤维蛋白原的作用，它们的分子中都含有金属Zn。

出血毒素主要含于蝮蛇科和蝰蛇科的毒蛇蛇毒中（Lee C. Y., 1979）。近年来很多研究者从这两科的多种蛇毒中分离纯化了出血毒素（Oshima *et al*., 1972; Bjarnason and A. T. Tu, 1978; Xu Xun *et al*., 1981; Nikai *et al*., 1984; Civello *et al*., 1983; Nikai *et al*., 1982; Ohsaka *et al*., 1973; Mori *et al*., 1984; Huang *et al*., 1984; Mandelbaum *et al*., 1984）并对它们的性质进行了研究。从他们的报道中说明一种蛇毒不只含一个出血毒素且性质上有不少差异。

巴西巨蝮蛇（*Lachesis muta*）分布于尼加拉瓜、哥斯达黎加和巴西，身长可达12英尺。到目前为止，对巴西巨蝮蛇毒的生物化学性质则尚少研究。Gutierrez and Cha-

本文1987年3月23日收到，1987年6月8日收到修改稿。

ves (1980) 报道了巴西巨蝮蛇毒可引起出血，但未纯化其出血毒素。本文报道从巴西巨蝮蛇毒中分离纯化了两个出血毒素及其部分性质。

材 料

冰冻干燥的巴西巨蝮蛇（*Lachesis muta*）毒购自 Miami Serpentarium 实验室，Sephadex G-75、DEAE-Sephadex A-50，Pharmacia 产品；两性电解质（pH 范围从3.5到10和5到8），LKB 产品；高压液相层析仪（HPLC），Beckman 产品；苯酰基-L-精氨酸乙酯（BAEE）、对苯磺酰-L-精氨酸甲酯（TAME）、丙烯酰胺、NN-亚甲基双丙烯酰胺、测定分子量用的标准蛋白质和一般常用试剂均为Sigma产品。

方法和结果

一、出血毒素的分离纯化

1. Sephadex G-75 过滤　500毫克粗毒悬浮于0.01*M* Tris-HCl缓冲液中（pH 7.9），将不溶的沉淀离心弃去，上清液加在事先用含0.1*M* NaCl的0.01*M* Tris-HCl缓冲液平衡的Sephadex G-75 柱（3×92 cm）上，用平衡缓冲液洗脱。自动部分收集器收集，20分钟收集一管，每管3毫升。分离结果见图1A。从图A中看出，粗毒分七个蛋白峰。对各蛋白峰进行出血活性测定，发现峰Ⅰ和峰Ⅳ具有强的出血活性。合并峰Ⅰ和峰Ⅳ，分别对去离子水透析，然后冻干进行下一步纯化。

2. DEAE-Sephadex A-50离子交换层析　将峰Ⅳ的冻干样品溶于0.01*M* Tris-HCl缓冲液中（pH7.9），加入先用缓冲液平衡好的 DEAE-Sephadex A-50 柱（2.3×34cm）上，用同一缓冲液洗脱至无蛋白峰出现后，改用0—0.3*M* NaCl直线梯度洗脱。流速为每20分钟3毫升/管。结果见图1B。在层析分离的三个蛋白峰中，峰Ⅳ—Ⅱ的蛋白含量最高，峰Ⅳ—Ⅲ次之，峰Ⅳ—Ⅰ最低。由于峰Ⅳ—Ⅰ的量很少，所以只检查了峰Ⅳ—Ⅱ和峰Ⅳ—Ⅲ的出血活性。结果表明都具有出血活性，但峰Ⅳ—Ⅱ比峰Ⅳ—Ⅲ弱得多。两个蛋白峰经透析和冻干后再用高压液相柱进一步纯化。

3. 高压液相层析（HPLC层析）　将上述峰Ⅳ—Ⅱ和峰Ⅳ—Ⅲ进一步用DEAE-3 SW Spherogel HPLC 柱（0.75×7.5cm）纯化。洗脱液采用0.05*M* 磷酸钠缓冲液（pH7.4），直线梯度是0～0.25*M* NaCl。用280nm 波长监测，收集蛋白峰。图1中的C和D分别是Ⅳ—Ⅱ和Ⅳ—Ⅲ在HPLC柱上的分离结果。将这两个标有阴影的蛋白峰分别对去离子水透析去盐后，冰冻干燥。用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定都显现单一蛋白带。

二、出血活性测定

按Ownby C. L. *et al.*, (1978) 的方法测定出血活性。每5只小白鼠为一组，分别在各组背部皮下注射0.1毫升溶于0.9%NaCl中的不同浓度样品液，注射六小时后，用氯仿处死，剥下小鼠皮肤并测量注射部位皮肤出血斑的面积。规定以0.5cm直径大小的出血斑为最小出血剂量。测定表明，Ⅳ—Ⅱ的最小出血剂量为25微克，Ⅳ—Ⅲ的最小出血剂量是0.5微克，粗毒为2微克。显然Ⅳ—Ⅲ的出血活性比Ⅳ—Ⅱ强，而Ⅳ—Ⅱ的

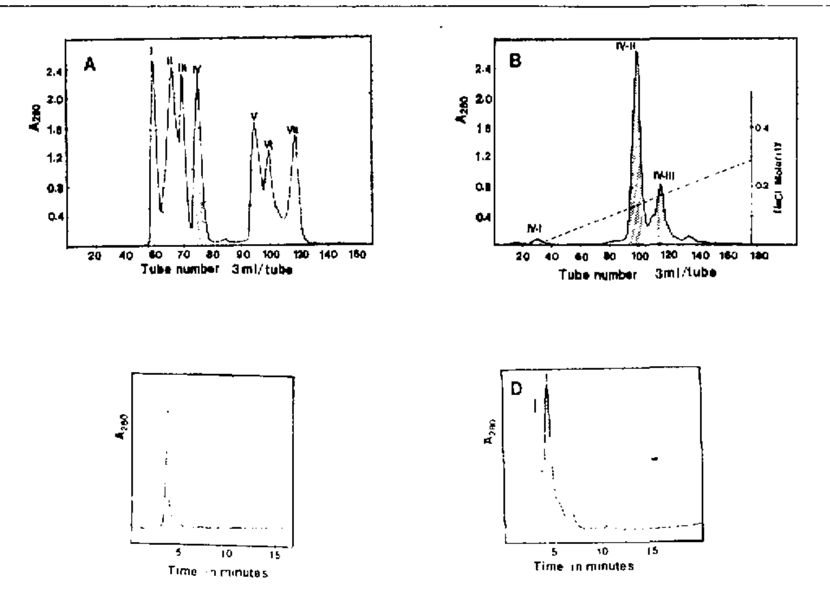


Figure 1 Separation and purification of hemorrhagic toxins from *Lachesis Muta* venom

A. Isolation of hemorrhagic toxins a and b from *Lachesis Muta* venom on Sephadex G-75-40. Column size was 3×92 cm, at 4 °C, and the solvent was 0.01 *M* Tris-HCl buffer containing 0.1 *M* NaCl, pH 7.9. Flow rate of 9 ml/h was used with 3 ml fractions collected.

B. Purification of hemorrhagic toxins a and b from the peak Ⅳ of Sephadex G-75-40 by DEAE-Sephadex A-50. Column size was 2.3×34cm, at 4°C, and the solvent was 0.01 *M* Tris buffer, pH 7.9, with a linear gradient from O to 0.4 *M* NaCl in total volume of 1000 ml. Flow rate of 9 ml/h was used with 3 ml fractions collected.

C. Purification of hemorrhagic toxin a from the peak Ⅳ—Ⅰ of DEAE-Sephadex A-50 on HPLC with DEAE-3 SW Spherogel column (0.75×7.5cm) and the solvent was 0.05 *M* sodium phosphate buffer, pH 7.4. Gradient was from O to 0.25 *M* NaCl in the same buffer.

D. Purification of hemorrhagic toxin b from the peak Ⅳ—Ⅱ of DEAE-Sephadex A-50 on HPLC with DEAE-3 SW Spherogel column (0.75×75cm) and the solvent was 0.05 *M* sodium phosphate buffer, pH 7.4. Gradient was from O to 0.25 *M* NaCl in the same buffer.

出血活性比粗毒还弱约十二倍。

三、分子量和等电点测定

应用常规的SDS-聚丙酰胺凝胶电泳方法测定纯化组分的分子量。以牛血清白蛋白（MW.66,000）、蛋清白蛋白（MW. 45,000）、甘油三磷酸脱氢酶(MW. 36,000)、碳酸酐酶（MW. 29,000）、胰蛋白酶原（MW. 24,000）、胰蛋白酶抑制剂（MW.

20,000）和α—乳白蛋白（MW. 14,200）作为标准蛋白，以11%的聚丙酰胺凝胶浓度进行电泳。用插入法从电泳染色的蛋白带求得未知分子量样品的Rf值，再从标准蛋白的对数坐标图上读取所测样品的分子量。用这种方法测得Ⅳ—Ⅱ的分量子是22,000，Ⅳ—Ⅲ的分子量为23,000。

等电点的测定是采用聚丙酰胺凝胶的等电聚焦方法。两性电解质的pH范围是用pH 3.5～10进行初测，当大约知道样品的等电点在pH6左右后，改用pH5—8范围的两性电解质对所测样品进行聚焦测定，测得Ⅳ—Ⅱ的等电点为6.50，而Ⅳ—Ⅲ的等电点是6.12。

四、酶活力测定

1.蛋白水解酶的活力测定　按Kunitz（1947）的方法，以酪蛋白作底物，酶与变性的酪蛋白在37°C水浴中反应一定时间后，用三氯醋酸沉淀未水解的酪蛋白。过滤后，将上清液与Folin酚等试剂显色，测定660nm光密度。用Tu A. T. *et al.*（1967）的方法计算酶的活力。即：

$$酶活力（单位/毫克酶）= \frac{（吸收变化/分钟）\times 1000}{毫克酶}$$

Ⅳ—Ⅱ的活力为8.08单位/毫克酶·分钟，Ⅳ—Ⅲ的活力是8.2单位/毫克酶·分钟。

2.精氨酸酯酶活力测定　用对苯磺酰-L-精氨酸甲酯（TAME）和苯甲酰精氨酸乙酯（BAEE）作底物。TAME和BAEE作底物的活力测定按Tu A. T.(1967）的方法分别测定反应液的247nm和253nm光密度。实验结果，这两个纯化的出血毒素都不显示精氨酸酯酶的活力。

3.磷酸酯酶A_2的测定　根据Wells and Hanahan（1969）的方法，磷酯酰胆碱作底物。25微升酶溶液加入2毫升溶在95%乙醚和5%甲醇中的底物溶液（15μ moles/ml）内，剧烈摇动30秒钟后，在室温下放置10分钟。加入5ml 95%的乙醇来测定反应液。当一加入95%乙醇后，立即用溶在90%乙醇中的0.02M NaOH滴定释放出的脂肪酸，加入1滴酚红作为指示剂。用此法没有测出Ⅳ—Ⅱ和Ⅳ—Ⅲ的磷酯酶A_2的活力。

五、氨基酸组成分析

参照Heinrikson等（1985）的方法，将氨基酸转换成异硫氰酸苯脂后，应用C_{18}反相柱（0.46×25cm）在HPLC的254nm吸收进行分析。色氨酸分析采用Edelhock H.（1967）方法，让蛋白溶解于6M盐酸胍中，测定溶液288和280nm的吸收，由读数计算色氨酸的含量。

氨基酸组成分析结果见表Ⅰ。出血毒素Ⅳ—Ⅱ由196个氨基酸残基组成，Ⅳ—Ⅲ由204个氨基酸残基组成。用分光光度法没有测出这两个组分的色氨酸。表Ⅰ表明，它们的氨基酸含量很接近，只是Ⅳ—Ⅲ中的Gl×和phe明显地多于Ⅳ—Ⅱ，而1/2 Cys少于Ⅳ—Ⅱ。

六、出血毒素对纤维蛋白原的作用

按Ouyang和Teng（1976）的方法，配制1%的纤维蛋白原溶液（溶在10 mM 咪唑溶液中）。取0.1毫升1%纤维蛋白原溶液与0.1毫升样品溶液（每毫升10微克）在37°C

Table Ⅰ. Amino Acid Composition and Molecular Weight of Hemorrhagic Toxins from *Lachesis Muta Venom*

Amino Acid	Residues	
	Hemorrhage a	Hemorrhage b
Asx	26	27
Glx	18	23
Ser	16	18
Gly	11	12
His	8	7
Thr	25	23
Arg	8	8
Ala	10	9
Pro	5	6
Tyr	6	6
Met	3	2
Val	5	7
1/2 Cys	16	11
Ile	7	7
Leu	12	12
Lys	5	7
Phe	15	19
Total residues	196	204
MW based amino acid analysis	21,911 daltons	22,992 daltons
MW based on SDS electrophoresis	22,000 daltons	23,000 daltons

水浴中保温，按指定时间取出放入冰浴中停止反应。这样得到的水解混和液经过SDS和β-巯基乙醇变性后，用聚丙烯酰胺凝胶电泳检查酶解结果（见图2中A和B及图3中的A和B）。图2中，A是出血毒素Ⅳ—Ⅰ，命名为出血毒素a，B是Ⅳ—Ⅱ，命名为出血毒素b。图3中，A是胞浆素对纤维蛋白原的水解结果，B是凝血酶对纤维蛋白原的水解图谱。从图2中可以看到纯化的两个酶首先水解纤维蛋白原中的α-链，接着水解β-链。随着保温时间的延长，β-链逐渐变小。因此，纯化的这两个带蛋白酶活力的出血毒素极似胞浆素对纤维蛋白原的作用，且活力很强。与图3中的B比较，显然不同于凝血酶对纤维蛋白原的作用。

七、最适温度测定

最适温度的测定是采用常规测定蛋白水解酶的方法，只是酶与底物酪蛋白保温的温度不同。本实验选择了25°、30°、35°、40°、45°、50°、55°、60°、70°、80°和90°C等11种温度下保温，然后用三氯醋酸停止反应。经Folin酚试剂显色后，测定660nm的光密度。从图4可知，在上述实验条件下，出血毒素a（Ⅳ—Ⅰ）和b（Ⅳ—Ⅱ）的最适温度均为50°C。

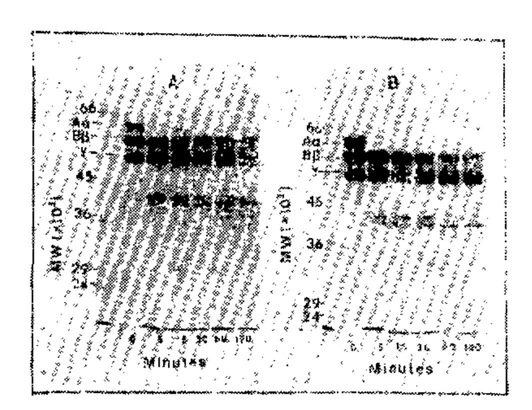


Figure 2. Proteolytic acion of hemorrhagic toxins a and b on fibrinogen

A. Reduced SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of fibrinogen degradation products by the hemorrhagic toxin a. Lanes 2 through 7: Fibrinogen + the hemorrhagic toxin a (10μg/ml) incubated for 0, 5, 15, 30, 60, and 120 min. Lanes 1: Protein standards with shown molecular weights.

B. Reduced SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of fibrinogen degradation products by the hemorrhagic toxin b. Lanes 2 through 7: Fibrinogen + the hemorrhagic toxin b (10μg/ml) incubated for 0, 5, 15, 30, 60, and 120 min. Lane 1: Protein standards with shown molecular weights.

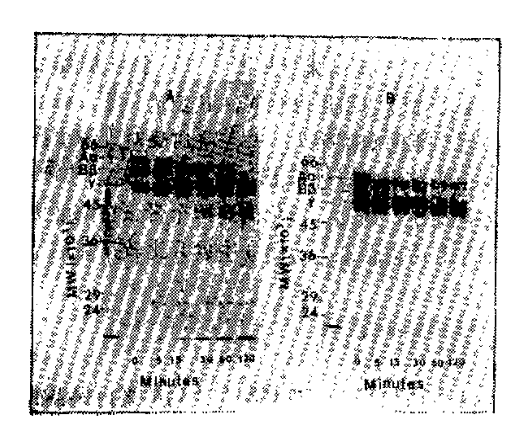


Figure 3. Proteolytic action of plasmin and thrombin on fibrinogen

A. Reduced SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of fibrinogen degradation products by plasmin.
Lanes 2 through 7: Fibrinogen + plasmin (0.1 unit/ml) incubated for 0, 5, 15, 30, 60, and 120 min.
Lanes 1: Protein standards with shown molecular weights.

B. Reduced SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of fibrinogen degradation products by thrombin.
Lanes 2 to 7: Fibrinogen + thrombin (10 units/ml) incubated for 0, 5, 15, 30, 60, and 120 min.
Lane 1: Protein standards with shown molecular weights.

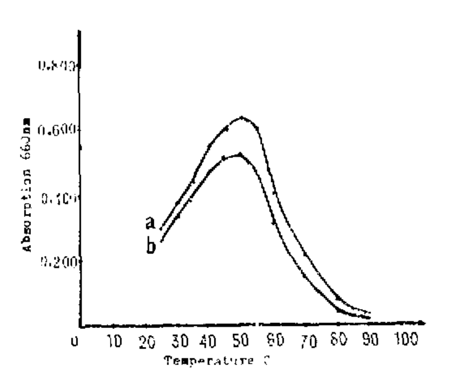


Figure 4. Proteolytic effect of hemorrhagic toxins a and b on casein under different temperatures.

八、金属离子的测定

金属离子的分析借助于 Beckman 原子吸收调节系统（Model 1301, DB-G Spectrophotometer）进行。用样品透析液作对照，所有的溶液都用去离子的玻璃蒸馏水配制。分析计算结果，每克分子的Ⅳ—Ⅰ含有0.76克分子 Zn 离子，而每克分子Ⅳ—Ⅱ含有0.77克分子的 Zn 离子。我们还测定了 Ca、Fe、Mg 和K等离子，但计算结果，它们的含量几乎接近于零。

讨　论

我们采用 Sephadex G-75 凝胶过滤对巴西巨蝮蛇（*Lachesis muta*）毒进行第一步分离时获得了七个蛋白峰，其中峰Ⅰ和峰Ⅳ都具有出血活性。然后将峰Ⅳ再经过 DEAE-Sephadex A-50 和 HPLC 柱层析得到了 SDS 凝胶电泳纯的出血毒素 a 和 b（Ⅳ—Ⅰ和Ⅳ—Ⅱ）。由此可知，巴西巨蝮蛇毒至少含有三个以上的出血毒素。

纯化的两个出血毒素对底物酪蛋白具有水解作用，而且都含有金属离子锌。Nikai *et al.*（1982）研究了出血、蛋白水解活力和锌离子含量之间的关系后，认为出血毒素都具有蛋白水解活力并含有锌离子。不管什么地区的毒蛇蛇毒的出血毒素含锌的量是相同的。我们的实验结果也支持了他们的结论。

出血毒素Ⅳ—Ⅰ和Ⅳ—Ⅱ对纤维蛋白原的水解试验结果，可以看到它们首先水解纤维蛋白原的Aα链，而且水解速度很快，接着水解Bβ链，但水解的速度较慢。从图 2 可以看出保温120分钟时几乎只水解 Bβ 链的一半。我们将酶量加大一倍，保温120分钟，Bβ链全部消失。这结果表明，它们与凝血酶有区别，应属于Aα和Bβ类型的纤维蛋白原酶。

有趣的是，出血毒素Ⅳ—Ⅰ和Ⅳ—Ⅱ的的分子量只相差 1,000，等电点非常接近，对酪蛋白的水解活力和对酪蛋白水解的最适温度相等，而其出血活性为何相差如此之大？这或因结构不同而引起出血功能的不同。从氨基酸的组成分析得知，Ⅳ—Ⅰ含有16个半胱氨酸，而Ⅳ—Ⅱ只有11个半胱氨酸。前者可在蛋白中形成 8 对二硫键，后者只能形成 5 对二硫键，蛋白质中二硫键对稳定空间结构起着重要作用。为证实它们的结构差异，我们测定了这两个成分N-末端的部分氨基酸顺序和 Raman 光谱分析，结果将另加整理报道。

参 考 文 献

Bjarnason J. B. and Tu A. T. 1978 Hemorrhagic toxins from western diamondback (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochemistry* 17, 3395

Civello *et al*. 1983 Isolation and characterization of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. *Biochemistry* 22, 749

Edelhoch H, 1967 Spectroscopic determination of tryptophan and tyrpposine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948

Gutierrez J. M. and Chaves F. 1980 Proteolytic hemorrhagic and myonecrotic effects of the venoms of Costa Rican snakes from the genera *Bothrops*, *Crotalus*. and *Lachesis*. *Toxicon* 18, 315

Heinrikson R. L. and Meredith S. C. 1984 Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisot hiocyanate. *Anal. Biochem.* 136. 65

Huang *et al*. 1984 Characterization of hemorrhagic principles from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon* 22, 45

Kunitz 1947 Crystalline soybean trypsin inhibitor. IIa. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291

Lee C. Y. 1979 Hemorrhagic effect in Snake Venom. p. 486 Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

Mandelbaum *et al*. 1984 Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (Jararaca pintada). *Toxicon* 22, 193

Mori *et al*. 1984 Purification of a proteinase (AC_5-proteinase) and characterization of hemorrhagic toxins from the venom of the hundredpase snake (*Agkistrodon acutus*). *Toxicon* 22, 451

Nikai *et al*. 1982 Presence of zinc in proteolytic hemorrhagic toxin isolated from *Agkistrodon acutus* venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 72, 103

Nikai *et al*. 1984 Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). *Archs. Biochem. Biophys.* 231, 309

Ohsaka *et al*. 1973 Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. *Biochim. Biophys. acta.* 323, 415

Oshima *et al*. 1972 Studies on snake venom hemorrhagic factor I (HR-I) in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *J. Biochem.*, Tokyo 72, 1483

Ouyng and Teng 1976 Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus Mucros quamatus* venom. *Biochimica et Biophysica Acta.* 420, 298

Ownby C. L. *et al*. 1978 Hemorrhagic toxins from Rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Am. J. Pathol.* 93, 201

Tu A. T. *et al*. 1967 Hemorrhagic and proteolytic activities of Thailand snake venoms. 16, 2125

Xu Xun *et al*. 1981 Purification and characterization of hemorrhagic components from *Agkistrodon acutus* (hundred pace snake) venom. *Toxicon* 19, 633

Wells and Hanahan 1969 Studies on phospholipase A. I. Isolation and characterization of two enzymes from *Crotalus adamanteus* venom. *Biochemistry* 8, 414

STUDIES ON PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HEMORRHAGIC TOXINS FROM LACHESIS MUTA VENOM

Ran Yonglu
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Anthony T. Tu
(Department of Biochemistry, Colorado State University Fort, Collins, Colorado 80523 USA)

Hemorrhagic toxins Ⅳ—Ⅰ and Ⅳ—Ⅱ with proteolytic activity were isolated from *Lachesis muta* venom by Sephadex G-75, DEAE-Sephadex A-50 and DEAE-3 SW Spherogel HPLC. They both have a single band on SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram. Ⅳ—Ⅰ has a molecular weight of 22,000 with 196 amino acid residues. And Ⅳ—Ⅱ has a molecular weight of 23,000 with 204 amino acid residues. The isoelectric points of Ⅳ—Ⅰ and Ⅳ—Ⅱ are 6.5 and 6.12, respectively. Both contain 0.77 mole of zinc per mole of protein. The Aα and Bβ chains of fibrinogen were hydrolyzed without affecting r chain. The optimal temperature is 50°C.

Key words　*Lachesis muta*　Hemorrhagic toxin　Gel filtration　Chromatography　Straight gradient　Fibrinogen